

АДАПТАЦИЯ МЕТОДИКИ ДНК–ДИАГНОСТИКИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА ВЫЯВЛЕНИЕ МУТАЦИИ В ГЕНЕ MSTN

Е.С. Сильченко¹, 6 курс

Научный руководитель – Н.А. Глинская¹, к.с.–х.н.

О.А. Епишко², к.с.–х.н.

¹Полесский государственный университет

²Гродненский государственный аграрный университет

Среди мутаций крупного рогатого скота особый интерес привлекает мутация, обеспечивающая аномальное развитие мышечной массы – миостатин–mh. Тривиальное название мутации «двойной мускул» (синонимы: доппельлендеры, double–muscling, двойные мышцы, мышечная гипертрофия, мышечная суперплазмия и др.). Данная мутация рецессивна и ассоциирована с действием гена MSTN. Физиологическая сущность мутации миостатин–mh в преодолении генетического контроля за гипертрофированным ростом мышечной массы. Мутация миостатин–mh–0 на 20% увеличивает мышечную массу. В новых условиях использования домашних животных, как мини–биофабрики по биосинтезу мышечного белка, внедрение данной мутации в систему разведения откормочных пород не только возможно, но может являться важным селекционным достижением [2, 3].

В связи с этим нами были проведены исследования по подбору оптимального состава реакционной смеси, отработаны праймеры, а также подобраны температурный и временной режим ПЦР для проведения ДНК – диагностики на выявление мутации в гене MSTN крупного рогатого скота абердин–ангусской породы.

Исследования были проведены в научно–исследовательской лаборатории ДНК–технологий на базе УО «Гродненский государственный аграрный университет», а также в научно–исследовательской лаборатории «Промышленной и фундаментальной биотехнологии» на базе УО «Полесский государственный университет».

В качестве биологического материала использовали ткань (выщип уха) 10 животных абердин–ангусской породы, разводимых в коммунальном сельскохозяйственном унитарном предприятии «Озеранский» Мостовского района, Гродненской области. В процессе отработки режимов использовался свежий материал.

При подборе оптимальных условий было обращено особое внимание на экстрагирование ДНК, которое проводилось перхлоратным методом с двойной очисткой [1].

Для успешного проведения ПЦР были подобраны праймеры так, чтобы фрагмент между ними включал в себя сайты узнавания для А и В аллельных вариантов гена миостатина. Были использованы следующие последовательности прямого и обратного праймеров:

прямой праймер (F) : MSTN 1: 5' – TCTAGGAGAGATTTTGGGCTT – 3';

обратный праймер (R) : MSTN 2: 5' – TGGGTATGAGGATACTTTTGC – 3'.

Выбор праймеров был обусловлен меньшим числом фрагментов, получаемых при рестрикционном анализе, а, следовательно, более удобной идентификацией генотипов. Оптимальная концентрация праймеров была подобрана в серии тестов и составила 25 пМ.

Для оптимизации условий ПЦР определяющей является концентрация ионов магния. Она влияет как на специфичность, так и на выход продуктов реакции, оказывая воздействие на целый ряд процессов: диссоциацию цепей матрицы и продуктов ПЦР, отжиг праймеров, специфичность продуктов ПЦР, образование димеров праймеров, активность фермента и точность синтеза. Стандартная концентрация в 1х буфере для ПЦР составляет 1,5 мМ. При использовании праймеров MSTN1 и MSTN2 реакция амплификации фрагмента гена проходила более успешно при концентрации ионов магния 3 мМ.

Смесь 4–х дезоксирибонуклеотидтрифосфатов служит материалом, из которого в процессе ПЦР синтезируются цепи ДНК. Стандартной является концентрация 2 мМ (по 0,5 мМ каждого), однако мы использовали концентрацию 4 мМ.

При подборе концентрации Tag–полимеразы (стандартная концентрация 1 е.а. на реакцию) мы учитывали метод выделения ДНК (перхлоратный с двойной очисткой (по методу Зиновьевой)) и концентрацию фермента для каждого праймера. Для наших условий оптимальным явилось использование Tag–полимеразы в концентрации 1,5 е.а. на реакцию.

Лабораторно отработана амплификация в объеме 20 мкл реакционной смеси, в составе: 100 нг выделенной ДНК; 3 мМ – Mg^{2+} ; 4 мМ – dNTP; 1,5 мМ – буфер; 25 пМ – прямой праймер; 25 пМ – обратный праймер; 1,5 е.а. – Taq–полимеразы; H_2O – довести объем до 20 мкл.

Проведение реакции амплификации по гену миостатина (MSTN) проводили на автоматическом термоциклере (амплификаторе) типа TProfessionalBasic фирмы AppliedBiosystems используя следующую программу режима ПЦР: горячий старт – 94°C – 2 мин; денатурация – 94°C – 30 сек; отжиг – 60°C – 30 сек; синтез – 72°C – 1 мин (33 цикла); элонгация – 72 °C – 5 мин.

Концентрацию и специфичность амплификата оценивали электрофоретическим методом, для электрофореза использовался 1х TBE буфер. Детекция результатов амплификации проводилась с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле с бромфеноловым синим при V=110, в течении 50 мин.

По результатам амплификации были идентифицированы (без проведения рестрикции), следующие генотипы: AA (норма) – 196 п.о.; BB (мутация) – 185 п.о.; AB – 196 /185 п.о.

В результате исследований адаптирована методика проведения ПЦР анализа для генотипирования крупного рогатого скота абердин–ангусской породы по гену MSTN.

Список использованных источников

1. Введение в молекулярную генную диагностику сельскохозяйственных животных / Н.А. Зиновьева и [др.] – Дубровицы, 2002. – 112 с.
2. Коновалов, В.С. Новые тенденции использования эволюционно–запрещенных мутаций в селекции крупнорогатого скота / В.С. Коновалов. – межд. науч.–методич. конференция «Современные проблемы эволюционной биологии» – 2009. – электрон. дан. – режим доступа : <http://darwin200.narod.ru>, свободный.

3. Fahrenkrug, S.C. Technical Note: Direct Genotyping of the Double–MusclingLocus (mh) in Piedmontese and Belgian Blue Cattle by Fluorescent PCR / S.C. Fahrenkrug [et al.] // *Animal Science*. – 1999. Vol77. – P.2028–2030.